

# — 総説 —

## ホーム，スイートホーム — 口腔粘膜ティッシュエンジニアリングの展望 —

泉 健次

新潟大学医歯学総合研究科 生体組織再生工学分野

### Home, sweet home Overview of oral mucosa tissue engineering

Kenji Izumi

*Division of Biomimetics Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

平成 29 年 4 月 14 日受付 平成 29 年 4 月 21 日受理

キーワード：口腔粘膜，ティッシュエンジニアリング，上皮幹細胞，微小環境，種と土壌

#### 【はじめに】

再生医療は，ティッシュエンジニアリングと幹細胞生物学なくしては成り立たない<sup>1,2)</sup>。このテクノロジーの発達により，表皮，角膜，口腔粘膜から作製される上皮細胞シートを利用した再生医療は進んできた<sup>3,4)</sup>。一方，細胞シートの自己組織化過程や上皮幹細胞動態など未だに不明な点も多く，上皮再生原理を解明することは，上皮組織の再生医療をより高度化することに重要で，他の組織の再生医療に対しても有用な情報となり得る<sup>5,6)</sup>。筆者が口腔粘膜のティッシュエンジニアリングに関わり始めてからちょうど 20 年になる。本稿では，上皮再生に関する知見を解説しながら，筆者が携わってきた口腔粘膜ティッシュエンジニアリングの基礎・臨床についての概要を振り返り，より高度な上皮再生医療を目指すための起点としたい。

#### 【組織幹細胞とは】

動物の発生初期段階である胚の一部の内部細胞塊より作成される ES 細胞や，遺伝子導入で体細胞をリプログラミングして作成される iPS 細胞など，多能性幹細胞の研究は進歩と拡大の一途をたどっている<sup>2)</sup>。再生医療の発展のため，これらの幹細胞に関連した新しいテクノロジーやブレイクスルーに大きな期待が寄せられている。一方，これまでに神経系や骨格系，肝臓，膵臓などさまざまな臓器の中に各臓器特異的に組織の代謝・維持をコントロールする幹細胞が存在していることが明らかとなり，それらは組織（体性）幹細胞と呼ばれている。組織

幹細胞とは，生涯に渡り高い自己複製能力を持つと同時に，様々な組織を構成する分化した細胞を供給する能力を持ち，ES 細胞や iPS 細胞とは異なり，生体の組織・臓器内に数的にわずかではあるが実在する幹細胞である。生体を構成する細胞のほとんどは寿命に限りがあるが，組織が失われた際の組織再生に中心的な役割を果たす組織幹細胞に，新たに組織・臓器を構成する細胞を補給する能力があることによって，生体の恒常性が維持されている。また，組織幹細胞の多くは，単独では生存，機能できず，組織内のニッチと呼ばれる特殊な微小環境に生存し，維持・制御されていると言われている<sup>7-9)</sup>。したがって，組織幹細胞とその司令塔であるニッチは，発生学や幹細胞生物学に加え，細胞の老化やガン化を含めた再生医学研究分野において，また再生医療を実践するにあたり，その存在意義は計り知れない。

#### 【上皮系組織の再生医療】

上皮組織はヒトのからだにおいて体表や内臓など至るところに存在し，その発生，形態，機能は個々の組織で大きく異なる。しかしながら，各々の上皮組織には，組織再生や恒常性を担っている未分化状態にある上皮幹細胞や前駆細胞，すなわち体性幹細胞が存在する。このことは，“上皮組織”に一般的な共通点である<sup>10)</sup>。皮膚を代表とする上皮組織の幹細胞や前駆細胞は古くから研究されており，とくに表皮における幹細胞／前駆細胞を用いた細胞治療法（移植法）は，現在の再生医療のさきがけでもあり，最も歴史のある領域といえる<sup>11)</sup>。そのため上皮組織をはじめ，他の多くの臓器・組織の再生治療法の開発に大きな影響を与えてきた。具体的には，1975

年に米国ハーバード大学の Green らが、ヒトの表皮細胞を培養・増幅させる技術を開発したことを端緒として発展していった<sup>12)</sup>。彼らは、3T3-J2 細胞をフィーダー細胞として表皮細胞と共培養することで効率よく増幅することを見出した。そして、わずかに残った正常皮膚から単離した表皮幹細胞・前駆細胞から in vivo 組織と同様に in vitro で上皮細胞を重層化させ表皮を再構築することで、自家培養表皮シートを作成し、熱傷患者の治療に臨床応用することに成功したのである。この上皮細胞シート作成技術は他の上皮組織への応用も進んでいった。1997年に Pellegrini らは、患者自身の幹細胞・前駆細胞を用いた培養角膜上皮移植を報告した<sup>13)</sup>。この新規治療法では、患者自身の幹細胞を移植することが可能となり、片側性の角膜上皮疾患に対する治療法として有効性が示された。一方、両側性の眼疾患に対しては幹細胞ソースがないために、自家細胞移植法が実施できないでいた。この問題を解決したのが、非角化重層扁平上皮を呈し、上皮幹細胞・前駆細胞を含む口腔粘膜から採取した上皮細胞集団を用いた、培養口腔粘膜上皮シート移植法の開発であった<sup>14)</sup>。口腔粘膜上皮細胞と角膜上皮細胞とは完全に一致した性質を有するわけではないが、口腔粘膜上皮は角膜上皮と近い性質をもっており、機能的にも類似する性質であることが認められている<sup>15,16)</sup>。さらに2004年には西田ら<sup>17)</sup>が、それまでは酵素を用いて細胞シートを培養皿から剥がしていたが、温度応答性培養皿(37℃で細胞を培養した後に、20℃に温度低下させるだけで細胞シートを培養接着面から剥離・回収できるインテリジェント表面を持つ培養器材)を用いて作成された培養口腔粘膜上皮シートを用いた角膜治療を報告した。温度応答性培養皿が、化学的、物理的にも損傷を受けていない細胞自身が分泌した接着性タンパク質をそのまま保持した、生体組織に速やかに付着する細胞シートの採取を可能にしたことにより、様々な組織に由来した細胞シートを利用した再生医療が現在まで普及、発展している<sup>18)</sup>。培養口腔粘膜上皮シート移植はさらに、食道上皮の再生医療にも利用され、現在、世界レベルで臨床応用が進められている<sup>19,20)</sup>。

### 【口腔粘膜上皮の再生医療】

口腔粘膜においても1990年代前半に、口腔粘膜上皮細胞シート移植による口腔粘膜欠損の再建が報告されている<sup>21,22)</sup>。作成方法は Green らの方法に準じていた。また、表皮と異なり、フィーダー細胞を用いなくても口腔粘膜上皮細胞シート作成・移植が可能であることも明らかにされた<sup>23,24)</sup>。移植材としての口腔粘膜上皮細胞シートは、100%上皮細胞のみで構成され結合組織層が含まれていない。結合組織成分は、移植材の創面への接着・生着を助け、移植された上皮組織を支持し、創の収

縮を抑えるのに有効であることは自明であった。このため、細胞シートの創面への生着率は決して高いとはいえず、移植後の水疱形成やシートの剥離、さらに創収縮が少なくなかった<sup>25,26)</sup>。これは表皮細胞シート移植でも指摘されていた欠点であったが、口腔内移植では臨床的に顕著に現れた。また、上皮細胞シートは脆弱で、周囲組織と縫合しづらい欠点も併せ持っていた。皮肉なことに、口腔粘膜の欠損を再建するのに、口腔粘膜上皮細胞は理想的な細胞であるにもかかわらず、口腔粘膜上皮細胞シートが口腔内移植されるケースはその後報告がなくなった。こうした臨床経験から学ぶことは、移植後の水疱形成や上皮剥離、創収縮を未然に防ぐ移植材は、上皮結合組織成分を有する口腔粘膜、すなわち上皮層と結合組織層を一体化させて2層構造にしたものが、口腔粘膜上皮細胞シートよりも口腔粘膜欠損再建用移植材としては優れているということである<sup>27)</sup>。

### 【ティッシュエンジニアリングの3要素】

すでによく知られているとおり、ティッシュエンジニアリングには3つの要素が存在する。細胞と足場材と細胞を分化させるための生理活性物質(成長因子)である。再生医療における基盤技術であるティッシュエンジニアリングは、いかに細胞が分化するのをコントロールするかと、いかに組織構築を行うか、が肝要である。逆にティッシュエンジニアリングを駆使してこの二つを実現することが、再生医療の目標といえることができる<sup>28)</sup>。ただし、上皮系再生医療の場合は間葉系幹細胞と異なり、いかに未分化性を維持し、極端な分化を抑えることが再生医療の成功のカギであり、分化誘導よりも組織再構築がより重要となるので、口腔粘膜組織や皮膚の再生をより効果的に再現するには、足場材の開発と協調してティッシュエンジニアリングを進めていくことが必要である<sup>29,30)</sup>。

組織学的に皮膚、口腔粘膜は上皮と結合組織の2層から成り立っていることから、皮膚、口腔粘膜のティッシュエンジニアリング的アプローチ法は3つ存在する。1つめが、上皮のみ、2つめは結合組織のみ、3つめが上皮と結合組織を合体させて2層構造とするものである。温度応答性培養皿を利用した細胞シート工学は、1つめのアプローチ法に大きく貢献している。また、再生医療で利用される様々な生体適合性材料/バイオマテリアルは、生体材料工学の発展により足場材として開発されてきており、この領域の進歩は2つめのアプローチ法に寄与している。皮膚に関していえば、天然由来物質やタンパク質を含む細胞外基質、人工合成材料などを利用して、結合組織の主要な構成細胞である線維芽細胞を含む足場材は培養真皮として、線維芽細胞を含まない足場材単独

であれば人工真皮として、市販されている。そして、3つめのアプローチ法で作成されるのが、“培養皮膚”である<sup>31,32)</sup>。現在市販されている培養皮膚は、培養真皮や人工真皮の上に表皮を形成させた2層構造をもつ。標準的な仕様としては、足場材にI型コラーゲンを主体とした材料が使われることが多い。

### 【EVPOME の開発】

口腔領域では、口蓋部良性腫瘍摘出後に培養口腔粘膜（口腔粘膜線維芽細胞を組み込んだI型コラーゲン上に口腔粘膜上皮細胞を播種して作成した材料）を移植した症例報告が1つあるに過ぎなかった<sup>33)</sup>。1999年に筆者らの研究チームは口腔粘膜欠損の再建材料として、自家口腔粘膜上皮細胞を用い、臨床応用を目指すために結合組織成分を有する培養口腔粘膜（ex vivo produced oral mucosa equivalent (EVPOME)）を開発し、報告した<sup>27,34-36)</sup>。口腔粘膜のティッシュエンジニアリングが他の領域のそれに比べて大きく遅れている状況で、EVPOMEはこの領域の草分けといっても過言ではない。EVPOMEは、AlloDerm<sup>®</sup>という無細胞性ヒト新鮮屍体真皮を足場材とし、重層化したヒト口腔粘膜上皮の2層で構成されている（図1）。口腔粘膜線維芽細胞はこの足場材には組み込んでいない。AlloDerm<sup>®</sup>上に播種された培養口腔粘膜上皮細胞からin vivo口腔粘膜の組織像に類似した重層扁平上皮が再生されることから、この培養細胞集団中に口腔粘膜上皮幹細胞/前駆細胞が存在していることが間接的に証明される。EVPOMEに使用されるAlloDerm<sup>®</sup>には3つの特徴がある。まず、片面（乳頭状真皮）には正常な上皮基底膜が存在する。また、反対側の創に接着する面（網状真皮）は多孔性である。そして、材料（真皮）内には毛細血管のネットワークが存在する。当初の目的どおり、EVPOMEの臨床応用は本学歯学部付属病院口腔外科で2000年からスタートし、表在性の口腔がんや前癌病変の切除後、保存、補

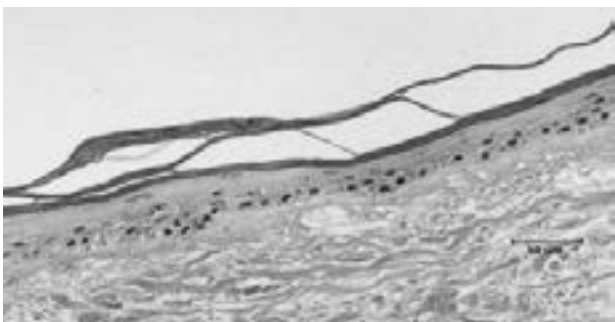


図1 口腔移植用EVPOMEの組織像（HE染色）  
AlloDerm<sup>®</sup>上に重層化した口腔扁平上皮が形成されている。AlloDerm<sup>®</sup>と上皮層の界面には、AlloDerm<sup>®</sup>に備わっている、いわゆる、表皮真皮間乳頭様構造が存在している。

綴科で行われる付着歯肉形成術などで使用されてきた<sup>37)</sup>。EVPOME移植症例では、AlloDerm<sup>®</sup>に細胞播種を行わずに単独で移植した対照群と比較し、良好な創傷治癒効果が得られた。その後、本邦では神戸大学や富山医科薬科大学（現富山大学）の口腔外科や、米国ミシガン大学口腔外科でもEVPOMEの口腔内移植が実施されている<sup>38-40)</sup>。

### 【EVPOME 移植後の創傷治癒メカニズム】

移植細胞が自家細胞であるべきという議論はEVPOMEに限らず、上皮細胞を用いた再生医療製品による細胞治療が直面する課題である。AlloDerm<sup>®</sup>を単独で移植した創に比べ、口腔粘膜上皮幹細胞/前駆細胞を含んでいるEVPOME移植による創傷治癒効果が高いメカニズムは移植された培養自家口腔粘膜上皮細胞が生着し、EVPOMEが自己組織化したことによるものか？研究チームで実施した免疫不全動物を用いた口腔内移植の実験的研究では、EVPOMEを構成していたヒト口腔粘膜上皮細胞は移植後3週目に消失していた<sup>41)</sup>。すなわち、創傷治癒効果が高いのは、移植細胞が創面に生着し、長期生存（自己組織化）することによるというメカニズムには否定的な結果で、むしろ細胞から放出される創傷治癒に関わる各種成長因子の供給源という、ドレッシング材として機能していることが示唆された<sup>42)</sup>。このことから、自家細胞を移植しても創面で永久生着はせず、生存が一時的であるならば、EVPOME移植に用いる細胞が自家細胞である必要は必ずしもなく、他家細胞の利用も可能になりうる。実際、難治性潰瘍に適応のある市販されている培養皮膚は他家細胞でできており、基本的にはバイオドレッシング材としての効能が期待されている<sup>43,44)</sup>。しかし、表皮と角膜では、移植細胞の長期生存を組織学的に認めたという報告があり<sup>45-47)</sup>、口腔粘膜においてもさらなる研究が待たれる。

### 【“種と土壌”理論】

本当に移植された自家細胞は創面に生着することはないのだろうか？幹細胞生物学に関して近年、“種（細胞）と土壌（微小環境）”理論が話題にのぼることがある<sup>48,49)</sup>。この理論で言うところの土壌とはすなわち、“幹細胞ニッチ”に他ならない。そこで筆者は最近、EVPOMEでは、AlloDerm<sup>®</sup>上の表皮真皮間乳頭様構造が口腔粘膜上皮幹細胞にとって至適な微小環境であるか、を自問自答するようになり、口腔粘膜上皮幹細胞/前駆細胞にとっての微小環境をエンジニアリングして、in vivoに徹底的に模倣（mimic）した足場でない限り、EVPOME移植後の培養細胞の長期生存は起り得ない

のではないかと考えるようになった。つまり、口腔粘膜上皮幹細胞にとって至適な微小環境は、AlloDerm<sup>®</sup>ではなく、“ヒト口腔粘膜下結合組織”から作成された足場材ということになる。しかし、現実的にその作成は不可能である。さらに、EVPOMEが移植される口腔内の創面は、周囲の非創傷部よりはるかに過酷な環境である。移植後の創に対するEVPOMEのパフォーマンスをより向上するには、答えは自ずと、精緻にin vivoを再現したEVPOME特異的な足場の開発が欠かせない、ということになる。

### 【AlloDerm<sup>®</sup>の課題】

ところで、筆者が長年EVPOMEの臨床応用に携わってきた経験から、本邦でAlloDerm<sup>®</sup>を用いるには解決しがたい3つの課題がある。1つめは、米国LifeCell社が製造販売しているAlloDerm<sup>®</sup>は、わが国で認可されていない医療用材料である。手に入れることは可能であるが、輸入しなければならず、コストがかかる。2つめは、AlloDerm<sup>®</sup>が厚いほど再生上皮の形成に悪影響を及ぼすことが証明されている<sup>50)</sup>。米国ではAlloDerm<sup>®</sup>の厚さの違いでカタログ番号が異なっているが、本邦からのオーダーではカタログ番号を指定できない。3つめは、正常な基底膜の存在がAlloDerm<sup>®</sup>の大きな特徴であるにもかかわらず、作成されたEVPOMEの再生口腔粘膜上皮の厚さはin vivoの厚さには及ばない。つまり、口腔粘膜版AlloDerm<sup>®</sup>の作成ができない以上、次世代バイオマテリアルとも言うべき新規足場材料の開発が必須となる。これには、医歯工連携を視野に入れたネットワーク形成も求められる。

### 【海産物由来バイオマテリアル】

ヒト臨床応用を目指す場合にまず考慮すべき問題は倫理面であり、人獣共通感染症のリスクは回避する必要がある。本学で使用している口腔粘膜上皮細胞培養システムでは、動物由来製品を含まない無血清培地を使用しているため、一層その重要性が増す。そこで筆者らの研究グループは、海産物由来コラーゲンに着目した<sup>51,52)</sup>。このアイデアが実現すると、国産で安全、安価な足場材の開発につながると考えられる。まず、ティラピアのうろこコラーゲン(I型)とキトサンの混合物を足場材とし、EVPOMEの作成に成功した<sup>51)</sup>。この足場材は、骨のティッシュエンジニアリングへの応用も考えて作成されたバイオマテリアルのため、多孔質で、播種した口腔粘膜上皮細胞が足場材の内部に落ち込んでしまうことがあった。そのため、続いてティラピアのうろこコラーゲン単独のゲルを作成し、このゲルでEVPOMEを作成した。しかし、

免疫組織化学的に検討を行ったところ、上皮層と足場材の界面に基底膜成分の沈着が乏しいことが明らかとなった。

### 【口腔粘膜インビトロモデル】

ここで話題をEVPOMEから一旦離したい。近年の動物実験に関する倫理的問題に絡み、実験動物の使用頻度削減と代替法の使用が求められている。上皮細胞のみで構成された製品であるが、現在、海外が製造元の2社からヒト口腔粘膜上皮の3次元インビトロモデルが販売されており、化学物質の毒性試験などに利用されている。わが国では2005年の法律改正により3Rs(Replacement; 代替法の利用, Reduction; 使用動物数の削減, Refinement; 苦痛の軽減)が初めて明文化され、ヒト組織モデルは動物実験の代替法として使用でき、実験動物の使用数を減少させることにも大きく貢献するので、今後需要が高まるのは必至である。3次元培養モデルは対象組織に類似した組織学的形態を有し、ヒトに投与される製品の安全性評価に必要なモデルである。筆者らのEVPOME作成のオリジナルの基盤技術は、そのままヒト口腔粘膜上皮のインビトロモデルとして利用可能であり、現在までにビスフォスフォネート関連顎骨壊死を対象とした軟組織に対する病態をモデル化した<sup>53,54)</sup>。さらに、AlloDerm<sup>®</sup>に替えて、口腔粘膜線維芽細胞を組み込んだI型コラーゲンを足場材として、口腔粘膜上皮細胞を播種して作成した3次元培養口腔粘膜モデル(3DOMM)も報告した(図2)。本モデルを利用して、義歯装着を模倣した環境を構築し、床下粘膜に与える影響についての解析も行っている<sup>55)</sup>。そもそも、

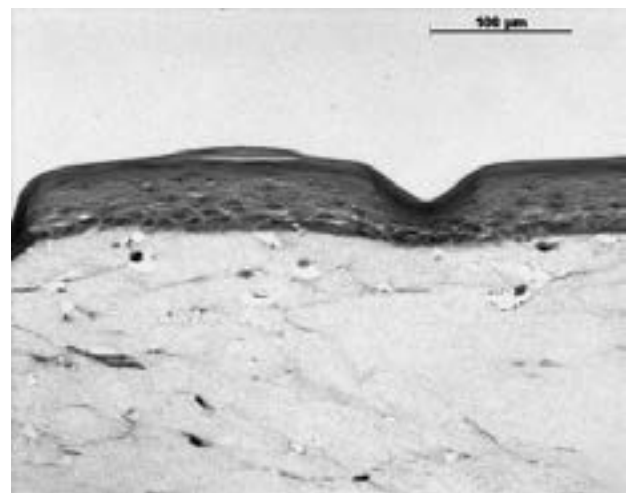


図2 3DOMMの組織像(HE染色)

口腔粘膜線維芽細胞を組み込んだI型コラーゲンゲル上に、重層化した口腔扁平上皮が形成されている。コラーゲンと上皮層の界面は平坦で乳頭様構造は存在しない。

組織や臓器は細胞が集合して形成されているが、in vivoで細胞は3次元環境にあり、決して2次元環境にあることはない。細胞が分泌する可溶性物質は、3次元培養環境では周囲に局在してとどまるのに対し、2次元培養環境では即座に希釈される結果、濃度勾配に大きな違いが生じることは容易に理解できる。つまり幹細胞ニッチをin vitroモデルで再現するには、少なくとも3次元培養技術が必須であることが想像できる<sup>56)</sup>。この傾向は世界的にも同様で、これまで様々なバイオマテリアルを足場とした口腔粘膜の3次元モデルが作成されている<sup>57)</sup>。

### 【口腔粘膜ティッシュエンジニアリング ストラテジーの展望】

話を元に戻そう。国産で安全、安価な足場材を開発し、臨床応用可能なEVPOMEを作成するストラテジーとして、前述した“種（細胞）と土壌（微小環境）”理論に基づいて、筆者らの研究グループは種と土壌の2方向からアプローチしている。

ティッシュエンジニアリング、幹細胞生物学の理論上、種（上皮幹細胞）が1つあれば、その細胞が分裂、分化を起こすことで、その細胞に由来する上皮組織は再生可能となる<sup>58)</sup>。上皮に限らず（組織）幹細胞は、細胞分裂の頻度がまれであること、コロニー形成能が高いこと、サイズが小さいこと、などが一般的に認められている特徴で、口腔粘膜上皮でも同様である<sup>59,60)</sup>。ただし、in vivoで上皮幹細胞の局在を同定し、in vitroで分取するには、（各上皮）組織特異的な幹細胞マーカーが同定されていることが必要で、それを利用することで“種”を単離することができる。種を得ることができれば、その特徴を徹底的に解析することができるので、種の長期保存や育成法の手がかりが得られ、ティッシュエンジニアリングの応用により、再生医療に直接結びつけられるストラテジーにつながる。口腔粘膜以外の代表的上皮である、毛包を含む毛包間表皮、毛包を含まない手掌表皮、角膜上皮、小腸上皮では、各上皮で信頼できる特異的なマーカーが見つかった<sup>58,61)</sup>、口腔粘膜上皮特異的な幹細胞マーカーは存在しない（報告がない）というのが現実である。このことが、口腔粘膜のティッシュエンジニアリングが他の領域より大きく立ち遅れている原因であることは明らかである。世界中の口腔粘膜の研究者たちはこれまでに、主に表皮で用いられているマーカーを口腔粘膜上皮幹細胞マーカーとして利用して、口腔粘膜上皮幹細胞の単離を試みてきたが、成功に至っていない<sup>58,59)</sup>。筆者の研究チームでも、ポジティブマーカー、ネガティブマーカーを組み合わせて検討を重ねてきた<sup>62)</sup>。種探しははまだ道半ばで、さらなる研究を進めている。

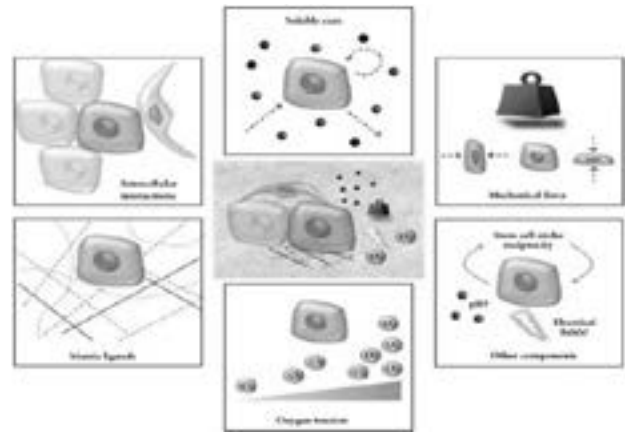


図3 Stem cell niche（土壌）を制御する様々な因子  
引用文献48より抜粋

### 【上皮再生のためのニッチバイオフィジクス】

一般に、生体に存在する組織幹細胞の増殖、分化、接着、運動などの生理学的細胞機能は細胞外の微小環境（図3）によって制御されている<sup>48,63)</sup>。従って、微小環境を理解、掌握して、その知見をin vitroの培養環境に活かし、in vivoに忠実に模倣した人工的幹細胞ニッチを構築することは、これからの再生医工学において重要となる。無数の種から目的とする1つの種を見つけ出すのは至難の業かも知れないが、目的とする種が好む“微小環境”を整備して、間接的に目的とする種を育むことができれば、筆者らが目指す目的は達成される。すなわち、これまでとは視線を変えて、生理的条件下で口腔粘膜の組織・細胞に負荷をかけている物理的微小環境を模倣し、EVPOME作成の基盤技術に応用できるのではなかつたという、“種”と併行して“土壌”へのアプローチ方法に着手した。物理的微小環境による細胞分化制御の例としては、ポリアクリルアミドゲル上で培養した間葉系幹細胞は、分化誘導因子の非存在下でもマトリックスの硬さの違いのみにより、神経、筋肉、骨という異なる組織への分化誘導が可能なることから、細胞外基質の硬さ、機械的性質が幹細胞動態に及ぼす影響が大きいことが理解できる<sup>56,64)</sup>。またこの傾向は、皮膚の創傷治癒過程でも認められる現象である<sup>65)</sup>。

### 【表皮真皮間乳頭様構造】

皮膚に機械的強度を付与している表皮真皮間乳頭様構造のおかげで、皮膚は伸びることができると言われているが、口腔粘膜しかりである。筆者らが注目しているのはヒト毛包間表皮のそれよりも深い、口腔粘膜上皮突起とそれと相補的な結合組織乳頭構造である（図4）<sup>66)</sup>。

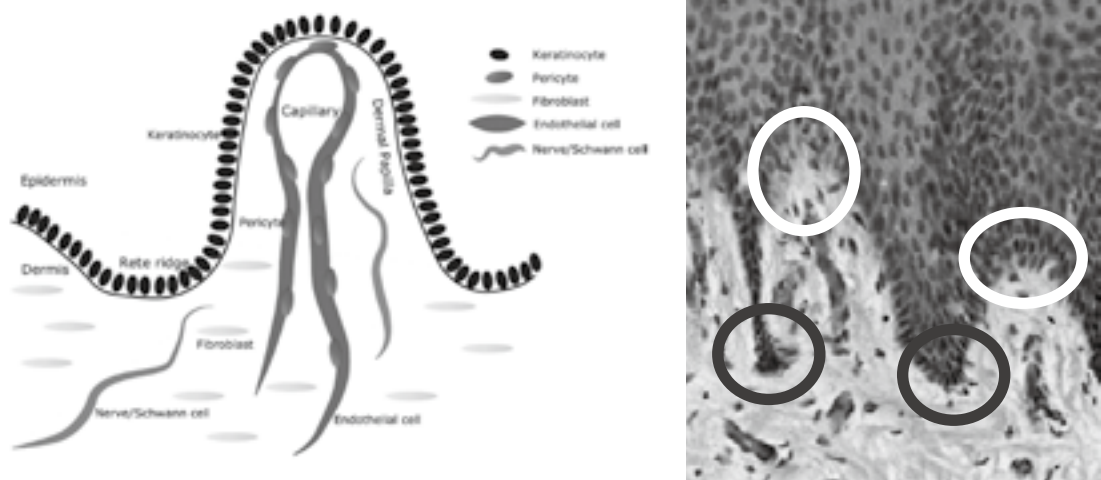


図4 表皮真皮間乳頭様構造の模式図(左:引用文献66より抜粋)と口腔粘膜における上皮-粘膜下結合組織間乳頭様構造(右:HE染色)。HE写真で示した白丸部分の凸状の結合組織乳頭部と、黒丸部分の凹面の結合組織が生み出す機械的、物理的微小環境は口腔粘膜特異的であると考えられる。この弯曲構造が、接している上皮細胞を制御している可能性がある。

意外にもマウスの皮膚にはこの構造が欠如しており、動物実験では再現することができない特殊な構造である<sup>66)</sup>。こうした観点から、EVPOMEに形成される再生上皮がin vivo口腔粘膜より薄いのは、AlloDerm<sup>®</sup>が真皮であることに起因している可能性は高い。また、老化に伴い乳頭構造が平坦化するという報告がある。平坦化に伴い上皮突起の湾曲度も変わり、その結果生じる物理的、力学的微小環境も変化すると予想される<sup>67-69)</sup>。同時に、組織内酸素濃度勾配も変化することが示唆される<sup>70)</sup>。このことは、低酸素誘導因子を発現している幹細胞比率は、老化に伴い減少するという報告ともリンクする可能性がある<sup>71)</sup>。現在検討中のため、具体的なデータを示すことができないのはお許し頂きたいが、これらの物理的微小環境は口腔粘膜上皮幹細胞にとって最適な微小環境を再現するのに欠かせない要素であると考えている<sup>72-75)</sup>。

### 【おわりに】

筆者らのグループが目目しているいくつかの物理的刺激をマニピュレートできても、最適な土壌を構築できるものではなく、他の物理的刺激や生理活性物質による生化学的的刺激と協調しなければ目的は達成されまい。その上、それらの刺激を受容する細胞の受容メカニズム、細胞内シグナル伝達経路の解明もあわせて行う必要がある。それでも、口腔粘膜組織を用いた再生医療において、従来と異なる方向からアプローチを行い、より徹底的に生体構造を模倣し、種にとって“懐かしく、居心地のよい我が家”をin vitroで再現していくことは、より高度で機能的な培養口腔粘膜の作成を目指すにあたり、決して遠回りではないかもしれない。そして、これを加速さ

せるために、医歯学と工学が連携した系統的な再生医療研究の推進も必要である。

### 【謝 辞】

稿の作成にあたり、貴重なコメントを頂いた高度口腔機能教育研究センターの加藤寛子先生に深く感謝申し上げます。

### 【文 献】

- 1) Wong VW, Sorkin M, Gurtner GC: Enabling stem cell therapies for tissue repair: Current and future challenges. *Biotechnology Advances*, 31: 744-751, 2013.
- 2) Mashayekhan S, Hajiabbas M, Fallah A: Chapter 26. Stem Cells in Tissue Engineering. In *Pluripotent Stem Cells*, ed Deepa Bhartiya and Nibedita Lenka, p 567-601, INTECH, 2013.
- 3) Vrana NE, Lavalle P, Dokmeci MR, Dehghani F, Ghaemmaghami AM, Khademhosseini A: Engineering Functional Epithelium for Regenerative Medicine and In Vitro Organ Models. A Review. *Tissue Eng, Part B* 19: 529-543, 2013.
- 4) Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T: Cell sheet engineering for regenerative medicine: Current challenges and strategies. *Biotechnol J*, 9: 904-914, 2014.
- 5) Hsu YC, Li L, Fuchs E: Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*, 20: 847-856, 2014.



- 6) Watt FM: Engineered Microenvironments to Direct Epidermal Stem Cell Behavior at Single-Cell Resolution. *Development Cell*, 38: 601-609, 2016.
- 7) Linheng L, Ting X: Stem cell niche: structure and function. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 21: 605-31, 2005.
- 8) Voog J, Jones LD: Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo. *Cell Stem Cell*, 6: 103-115, 2010.
- 9) Fuchs E, Tumber T, Guasch G: Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell*, 116:769-778, 2004.
- 10) Ghadially R: 25 YEARS OF EPIDERMAL STEM CELLS. *J Invest Dermatol*, 132: 797-810, 2012.
- 11) Pincelli C, Marconi A: Keratinocyte Stem Cells Biology and Clinical Applications. *Regenerative Medicine and Cell Therapy*: p 57-64, Humana Press, USA, 2013.
- 12) Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6: 331-343, 1975.
- 13) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M: Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, 349: 990-993, 1997.
- 14) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S: Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*, 88: 1280-1284, 2004.
- 15) Sozotono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi n, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Miyakoda K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S: Visual improvemetn after cultivated oral mucosa epithelial transplantation. *Ophthalmol*, 120: 193-200, 2013.
- 16) Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S: Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol*, 141: 267-275. 2006.
- 17) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351: 1187-1196, 2004.
- 18) Matsuura K, Utoh R, Nagase K, Okano T: Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *J Control Release*, 190: 228-239, 2014.
- 19) Ohki T, Yamato M, Okano T, Yamamoto M: Regenerative medicine: tissue-engineered cell sheet for the prevention of post-esophageal ESD stricture. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* 24: 273-281, 2014.
- 20) Kanai N, Yamato M, Okano T: Cell sheets engineering for esophageal regenerative medicine. *Ann Transl Med*, 2: 28, 2014.
- 21) De Luca M, Albanese E, Megna M, Cancedda RI, Mangiante PE, Cadoni A, Franzi AT: Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplant* 50: 454-459, 1990.
- 22) Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J, Blaauw EH, Witjes MH, Vissink A: Use of cultured mucosal grafts to cover defects caused by vestibuloplasty: An in vitro study. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 872-878, 1995.
- 23) Arenholt-Bindslev D, Jepsen A, MacCallum DK, Lillie JH: The growth and structure of human oral keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 88: 314-319, 1987.
- 24) Lauer G: Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium: Methods and clinical application. *J Craniomaxillofac Surg*, 22: 18-22, 1994.
- 25) Clugston PA, Snelling CFT, Macdonald IB, Maledy HL, Boyle JC, Germann E, Courtemanche AD, Wirtz P, Fitzpatrick, DJ, Kester DA, Foley B, Warren RJ, Carr NJ: Cultured epithelial autografts: Three years of clinical experience with eighteen patients. *J Burn Care Rehabil* 12: 533-539, 1991.
- 26) Cooper ML, Andee C, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Spielvogel RL: Direct comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice. *J Invest Dermatol*. 101: 811-819, 1993.
- 27) Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE:

- Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. *J Oral Maxillofac Surg* 57: 571-577, 1999.
- 28) Mao AS, Mooney DJ: Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112: 14452-14459, 2015.
- 29) Cheung ATM, Hu MS, Malhotra S, Lorenz PH, Longaker MT: Biomimetic Scaffolds for Skin and Skeletal Tissue Engineering. *J Biotechnol Biomater*, 5: 191, 2015.
- 30) MacNeil S: Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials today*, 11: 26-35, 2008.
- 31) Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT: Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Nanomed Nanobiotechnol*, 2: 510-525, 2010.
- 32) Nyame TT, Chiang AH, Leavitt T, Ozambela M, Orgill DP: Tissue-Engineered Skin Substitutes. *Plast Reconstr Surg*, 136: 1379-1388, 2015.
- 33) Ueda M, Ebata K, Kaneda T: In vitro fabrication of bioartificial mucosa for reconstruction of oral mucosa: Basic research and clinical application. *Ann Plast Surg* 27: 540-549, 1990.
- 34) Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE: Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res*, 79: 798-805, 2000.
- 35) Izumi K, Song J, Feinberg SE: Development of a Tissue Engineered Human Oral Mucosa: From the Bench to the Bed Side. *Cells Tissues Organs*, 176: 134-152, 2004.
- 36) Feinberg SE, Izumi K: Tissue Engineering of a Human Oral Mucosa for Tissue Repair and Regeneration. *Oral Biosci Med*, 2: 147-151, 2005.
- 37) Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M: Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 32: 188-197, 2003.
- 38) 寺師浩人, 泉 健次, 田原真也, 横尾 聡, 古森孝英, 芳澤享子, 鈴木一郎, 齊藤 力, 飯田明彦, 高木律男, 津野宏彰, 古田 勲: 培養複合口腔粘膜の臨床応用. 頭頸部癌, 32 : 276-280, 2006.
- 39) 芳澤享子, 泉 健次, 飯田明彦, 鈴木一郎, 齊藤力, 高木律男, 寺師浩人, 横尾 聡, 古森孝英, 津野宏彰, 古田 勲: 培養複合口腔粘膜 (EVPOME) の口腔癌治療への応用. 日本再生医療学会雑誌, 6 : 203-208, 2007.
- 40) Izumi K, Neiva RF, Feinberg SE: Intraoral grafting of tissue-engineered human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 28: 295-303e, 2013.
- 41) Yoshizawa M, Koyama T, Kojima T, Kato H, Ono Y, Saito C: Keratinocytes of Tissue-Engineered Human Oral Mucosa Promote Re-Epithelialization After Intraoral Grafting in Athymic Mice. *J Oral Maxillofac Surg*, 70: 1199-1214, 2012.
- 42) Supp DM, Boyce ST: Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clinics in Dermatology*, 23: 403-412, 2005.
- 43) MacNeil S: Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445: 874-880, 2007.
- 44) Shevchenko RV, James SL and James ES: A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*, 7: 229-258, 2010.
- 45) Counter CM, Press W, Compton CC: Telomere shortening in cultured autografts of patients with burns. *Lancet* 361: 1345-1346, 2003.
- 46) Rosa LD, Carulli S, Cocchiarella F, Quaglino D, Enzo E, Franchini E, Giannetti A, Santis GD, Recchia A, Pellegrini G: Long-Term Stability and Safety of Transgenic Cultured Epidermal Stem Cells in Gene Therapy of Junctional Epidermolysis Bullosa. *Stem Cell Rep* 2: 1-8, 2014.
- 47) Sugiyama H, Yamato M, Nishida K, Okano T: Evidence of the Survival of Ectopically Transplanted Oral Mucosal Epithelial Stem Cells After Repeated Wounding of Cornea. *Mol Ther* 22: 1544-1555, 2014.
- 48) Wong VW, Levi B, Rajadas J, Longaker MT, Gurtner GC: Stem Cell Niches for Skin Regeneration. *Int J Biomater* 2012: 1-8, 2012.
- 49) Hyun JS, Montoro DT, Lo DD, Flynn RA, Wong V, Chung MT, Longaker MT, Wan DC: The seed and the soil: Optimizing stem cells and their environment for tissue regeneration. *Ann Plast Surg*, 70: 235-239, 2013.
- 50) Kato H, Marcelo CL, Washington JB, Bingham EL, Feinberg SE: Fabrication of Large Size Ex Vivo-Produced Oral Mucosal Equivalents for Clinical Application. *Tissue Eng Part C Methods*, 21: 872-80, 2015.
- 51) Terada M, Izumi K, Ohnuki H, Saito T, Kato H, Yamamoto M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Kashiwazaki H, Ikoma T, Tanaka J, Maeda T: Construction and characterization of a tissue-engineered oral mucosa equivalent based on a chi-



- tosan-fish scale collagen composite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100: 1792-802, 2012.
- 52) 田中順三：最新のカラーゲンサイエンス - 生物多様性が促進するバイオ新素材変革 -. バイオインダストリー 11月号, CMC 出版, 東京, 2011.
- 53) Ohnuki H, Izumi K, Terada M, Saito T, Kato H, Suzuki A, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Takagi R, Maeda T: Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes. *Arch Oral Biol*, 57 (7) : 906-17, 2012.
- 54) Saito T, Izumi K, Shiomi A, Uenoyama A, Ohnuki H, Kato H, Terada M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Takagi R, Maeda T: Zoledronic acid impairs re-epithelialization through down-regulation of  $\alpha V \beta 6$  integrin and TGF $\beta$  signaling in a 3D in vitro wound healing model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 43 (3) : 373-380, 2014.
- 55) Shiomi A, Izumi K, Uenoyama A, Saito T, Saito N, Ohnuki H, Kato H, Kanatani M, Nomura S, Egusa H, Maeda T: Cyclic mechanical pressure-loading alters epithelial homeostasis in a three-dimensional in vitro oral mucosa model: Clinical implications for denture-wearers. *J Oral Rehabil* 42 (3) : 192-201, 2015.
- 56) Lee-Thedieck, Spatz JP: Biophysical regulation of hematopoietic stem cells. *Biomater Sci*, 2: 1548-1561, 2014.
- 57) Izumi K, Kato H, Feinberg SE: Three-dimensional reconstruction of oral mucosa; Tissue engineering strategies. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Science 1st Edition*, Chapter 53: 721-731, Academic Press/Elsevier, Waltham, MA, USA, 2014.
- 58) Barker N, Bartfeld S, Clevers H: Tissue-Resident Adult Stem Cell Populations of Rapidly Self-Renewing Organs. *Cell Stem Cell*, 7: 656-670, 2010.
- 59) Calenic B, Greabu M, Caruntu C, Tanase C, Battino M: Oral keratinocyte stem/progenitor cells: specific markers, molecular signaling pathways and potential uses. *Periodontology* 2000, 69: 68-82, 2015.
- 60) Jones KB, Klein OD: Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int J Oral Sci*, 5: 121-129, 2013.
- 61) Blanpain C, Fuchs E: Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*, 344: 1242281, 2014.
- 62) Kato H, Izumi K, Saito T, Ohnuki H, Terada M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Saito C, Maeda T: Distinct expression patterns and roles of aldehyde dehydrogenases in normal oral mucosa keratinocytes : Differential inhibitory effects of a pharmacological inhibitor and RNAi-mediated knockdown on cellular phenotype and epithelial morphology. *Histochem Cell Biol*, 139: 847-862, 2013.
- 63) Boehnke K, Falkowska-Hanseny B, Stark HJ, Boukamp P: Stem cells of the human epidermis and their niche: composition and function in epidermal regeneration and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 33: 1247-1258, 2012.
- 64) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126: 677-689, 2006.
- 65) Evans ND, Oreffo ROC, Healy E, Thurner PJ, Man YH: Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *J Mech Behav Biomed Mater* 28: 397-409, 2013.
- 66) Lawlor KT, Kaur P: Dermal Contributions to Human Interfollicular Epidermal Architecture and Self-Renewal. *Int J Mol* 16: 28098-28107, 2015.
- 67) Giangreco A, Goldie SJ, Failla V, Saintigny G, Watt FM: Human Skin Aging Is Associated with Reduced Expression of the Stem Cell Markers  $\beta 1$  Integrin and MCSP. *J Invest Dermatol*, 130: 604-608, 2010.
- 68) Lavker, RM: Structural Alterations in Exposed and Unexposed Aged Skin. *J Invest Dermatol*, 73: 59-66, 1979.
- 69) Abu Eid R, Sawair F, Landini G, Saku T: Age and the architecture of oral mucosa. *Age*, 34: 651-658, 2012.
- 70) Stücker M, Struk A, Altmeyer P, Herde M, Baumgärtl H, Lübbers DW: The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J Physiol*, 538: 985-994, 2002.
- 71) Duscher D, Barrera J, Wong WV, Maan NZ, Whittam JA, Januszyk M, Gurtner CG: Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review. *Gerontology*, 62: 216-225, 2016.
- 72) Kato H, Izumi K, Uenoyama A, Shiomi A, Kuo S,

- Feinberg SE: Hypoxia induces an undifferentiated phenotype of oral keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs*, 199: 393-404, 2014.
- 73) Bush AK, Pins DG: Development of Microfabricated Dermal Epidermal Regenerative Matrices to Evaluate the Role of Cellular Microenvironments on Epidermal Morphogenesis. *Tissue Eng Part A*, 18: 2343-2353, 2012.
- 74) Clement AL, Moutinho TJ Jr, Pins GD: Micropatterned dermal-epidermal regeneration matrices create functional niches that enhance epidermal morphogenesis. *Acta Biomater*, 9: 9474-9484, 2013.
- 75) Watt MF: Engineered Microenvironments to Direct Epidermal Stem Cell Behavior at Single-Cell Resolution. *Dev Cell*, 38: 601-609, 2016.